

基于网络药理学与实验验证的薏苡附子败酱散抗小鼠自发性结直肠癌肿瘤作用机制研究

张璐¹, 李波旺¹, 张玉丽², 柴妮³, 韩冰⁴, 刘怀民¹, 隋华^{2*}

1. 郑州大学附属肿瘤医院 (河南省肿瘤医院), 河南 郑州 450008

2. 上海市第一人民医院嘉定医院 经方方证研究中心, 上海 201803

3. 上海中医药大学附属岳阳医院, 上海 200437

4. 河南中医药大学第二附属医院, 河南 郑州 450002

摘要: 目的 探讨经方薏苡附子败酱散 (YYFZBJS) 对自发结直肠癌的基因工程小鼠 (Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}) 的抗肿瘤作用机制。方法 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}结直肠癌小鼠随机分为模型组和 YYFZBJS 低、中、高剂量 (3.825、7.650、15.300 g·kg⁻¹) 组, 对照组采用野生 C57BL/6J 小鼠。YYFZBJS 低、中、高剂量组 ig 给予相应剂量的 YYFZBJS, 对照组和模型组 ig 给予 0.9% 氯化钠溶液 12 周。检测小鼠肿瘤形成数目、肿瘤大小和肿瘤负荷量。HE 染色观察肿瘤分级, 免疫组织化学分析表征肿瘤细胞增殖的蛋白 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 的表达变化。运用中药系统药理学 TCMSP 平台分析 YYFZBJS 的主要活性成分, 并与结直肠癌靶点取交集, 利用 STRING 数据库和 Cytoscape 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络获得核心靶点; 采用 Metascape 数据库对交集靶点进行基因本体 (GO) 注释及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, Cytoscape 构建“药物-化合物-靶点”网络图, 利用 AutoDock Tools 对关键活性成分和核心靶点进行分子对接。Western blotting 检测肠道肿瘤组织中咪唑胺-2,3-双加氧酶 1 (IDO1)/芳香烃受体 (AhR)/β-连环蛋白 (β-catenin) 途径蛋白表达水平。结果 与对照组相比, 模型组 100% 的小鼠结肠中出现肿瘤, 主要为高级别上皮内瘤变。与模型组相比, YYFZBJS 低、中、高剂量组小鼠的毛色、生存状态均有所改善, 肿瘤数量分别为 7.88±2.00 (YYFZBJS 低剂量组)、6.13±2.17 (YYFZBJS 中剂量组) 和 3.13±1.55 (YYFZBJS 高剂量组), 差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。相较于模型组小鼠, YYFZBJS 低、中、高剂量组的肿瘤组织中 BrdU 表达明显降低 ($P<0.05$)。网络药理学结果显示 YYFZBJS 与结直肠癌共有靶点 183 个, 包含 IDO1、AhR、β-catenin 等, 涉及癌症途径、色氨酸代谢通路等。与模型组小鼠相比, YYFZBJS 高剂量组的肠道肿瘤组织的 IDO1、AhR 和 β-catenin 蛋白的表达显著下调 ($P<0.01$)。结论 YYFZBJS 能减缓大肠肿瘤的发展进程, 降低肿瘤的恶性分化程度, 其作用机制可能是通过调节色氨酸介导的 IDO1/AhR/β-catenin 途径有效抑制自发结直肠癌的发生。

关键词: 结肠癌自发模型; 色氨酸代谢; IDO1/AhR/β-catenin 通路; 薏苡附子败酱散; 网络药理学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)04-0887-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.04.010

Mechanism of Yi-Yi-Fu-Zi-Bai-Jiang-San inhibiting colorectal cancer progression in Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+} mice: Based on network pharmacology and experimental verification

ZHANG Lu¹, LI Bowang¹, ZHANG Yuli², CHAI Ni³, HAN Bing⁴, LIU Huaimin¹, SUI Hua²

1. The Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University & Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China

2. Jiading Branch of Shanghai General Hospital, Shanghai 201803, China

3. Yueyang Hospital affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China

4. The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China

收稿日期: 2024-08-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204887); 上海交大医工交叉项目 (YG2022QN082); 上海市科委生药支撑项目 (23S21901200); 河南省科技厅科技攻关项目 (242102310493); 河南省科技研发计划联合基金项目 (242301420116); 河南省中医药科学研究专项课题 (2024ZY2145)

作者简介: 张璐, 博士, 主治医师, 研究方向为中西医结合防治消化道肿瘤。E-mail: zhangluxs2018@126.com

*通信作者: 隋华, 博士, 副研究员, 研究方向为中西医结合防治消化道肿瘤。E-mail: syh0808@163.com

Abstract: Objective To investigate the effect of Yi-Yi-Fu-Zi-Bai-Jiang-San (YYFZBJS) on genetically engineered mice with spontaneous colorectal cancer (Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}). **Methods** Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+} colorectal cancer mice were randomly assigned to the model group, YYFZBJS (3.825, 7.650, 15.300 g·kg⁻¹) dose groups and the wild-type C57BL/6J mice served as the blank control group. The traditional Chinese medicine group was administered YYFZBJS via gavage, while the control and model groups received normal saline gavage for a duration of 12 weeks. Tumor formation, tumor size, and tumor load were subsequently assessed. HE staining was used to observe the tumor grade, and immunohistochemical analysis was performed to characterize the expression of the protein 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), which characterizes the proliferation of tumor cells. The principal bioactive constituents of YYFZBJS were identified utilizing the TCMSP analysis platform and subsequently cross-referenced with colorectal cancer-associated targets. Core targets were elucidated through the construction of a protein-protein interaction (PPI) network, employing the STRING database in conjunction with Cytoscape software. Further, gene ontology (GO) annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses for the intersection targets were performed using the Metascape database. Cytoscape was utilized to construct the "drug-compound-target" network diagram, while AutoDock Tools facilitated the molecular docking analysis between key active ingredients and core targets. The expression levels of proteins involved in the IDO1/AhR/β-catenin pathway in intestinal tumor tissues were subsequently assessed using Western blotting. **Results** In comparison to the normal control group, 100% of the mice in the model group developed colon tumors, predominantly high-grade intraepithelial neoplasia. Relative to the model group, the YYFZBJS intervention group exhibited improvements in hair color and survival status. The tumor counts in the intervention groups were 7.88 ± 2.00 (low dose), 6.13 ± 2.17 (medium dose), and 3.13 ± 1.55 (high dose), respectively, with statistically significant differences ($P < 0.01$). Additionally, the expression of BrdU in tumor tissues was significantly reduced in the Chinese medicine intervention group compared to the model group ($P < 0.05$). The network pharmacological analysis revealed that YYFZBJS shares 183 common targets with colorectal cancer, including IDO1, AhR, and β-catenin, which are implicated in both cancer pathways and the tryptophan metabolic pathway. In comparison to the model group, the expression levels of IDO1, AhR, and β-catenin proteins in the intestinal tumor tissues of the YYFZBJS high-dose group were significantly down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** YYFZBJS has been demonstrated to decelerate the progression of colorectal tumors and reduce the degree of malignant differentiation of tumors. The underlying mechanism of action is posited to involve the regulation of the IDO1/AhR/β-catenin pathway, mediated by tryptophan, thereby effectively inhibiting the occurrence of spontaneous colorectal cancer.

Key words: spontaneous model of colon cancer; tryptophan metabolism; IDO1/AhR/β-catenin pathway; Yi-Yi-Fu-Zi-Bai-Jiang-San; network pharmacology

结直肠癌 (CRC) 是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 在我国的发病率排名第 2, 死亡率排名第 4, 并随着社会生活习惯的改变, 呈现逐年上升趋势^[1]。早期大肠癌是指癌组织局限于黏膜及黏膜下层, 而不论其大小及是否有淋巴结转移。目前, 结直肠腺瘤 (CRA) 被认为是 CRC 最主要的癌前病变, 癌变率占全部癌前疾病的 85% 以上^[2]。其具有易恶变、易复发的特点, 被视为是 CRC 一级预防的关键阶段^[3-4]。西医防治肠道腺瘤的手段主要包括早期筛查、内镜下切除及药物治疗等, 但疾病复发率仍居高不下, 给患者带来了极大的经济和心理负担^[5]。近年来, 中医药在该病的治疗中逐渐凸显优势, 许多学者从脏腑^[6]、病机^[7]、证型^[8]等角度切入, 采用中药内服、灌肠、针灸、穴位注射等方式治疗^[9-11], 有效降低了腺瘤的复发率。

中医学将 CRA 归为“肠瘤”“肠覃”“息肉痔”等范畴, 认为其病机关键在于脾虚、湿蕴、血瘀,

治疗采用益气健脾、活血化瘀、清热化湿、除湿化滞的中药^[12-13]。薏苡附子败酱散 (YYFZBJS) 出自医圣张仲景的《金匮要略》。原方薏苡仁十分、附子二分、败酱草五分, 现代用法, 多将其改为汤剂, 常用剂量为“薏苡仁 30 g, 附子 6 g, 败酱草 15 g”, 用于治疗脾虚寒湿, 瘀血内结所致的肠痈。课题组前期临床研究发现: 对于慢性炎症性肠病和肠道腺瘤的患者, 服用 YYFZBJS 为主方的中药, 可以明显改善患者腹痛、腹泻、便血、里急后重等症状, 延缓 CRC 前病变的进展^[14]。同时, 动物实验显示 YYFZBJS 能够有效减少 Apc^{Min/+} 基因突变小鼠和氧化偶氮甲烷/葡聚糖硫酸钠 (AOM/DSS) 诱导性结肠炎相关性结肠癌的肠道肿瘤的数目和大小, 改善小鼠生命体征, 恢复肠道自发肿瘤小鼠的肠道内环境^[15-16]。但是由于 CRC 异种移植模型和致癌诱导模型的局限性, YYFZBJS 在预防 CRC 发生中的作用机制尚未明确。且多数研究集中在该方与化学

药的协同作用疗效以及加减化裁后的药效物质基础方面, 目前的研究未体现 YYFZBJS 多靶点和整体性特点, 对于 YYFZBJS 预防肠道肿瘤的分子机制仍认知有限。

因此, 本研究采用基因工程小鼠 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{flox/+} (通过 Cre-loxp 系统, 条件性敲除了小鼠结直肠上皮细胞 Apc 基因, 激活了 Kras 基因, 以自发地形式产生结直肠肿瘤小鼠模型), 其优势是临床相似性更高。同时本研究采用现代系统药理学和生物信息学方法, 通过网络药理学预测 YYFZBJS 防治 CRC 的具体作用靶点, 通过观察小鼠一般生存状态、肠道肿瘤数量等功能学方法分析, 并检测色氨酸 (Trp) 介导的吲哚胺-2,3-双加氧酶 1 (IDO1)/芳香烃受体 (AhR)/ β -连环蛋白 (β -catenin) 途径的变化, 旨在明确 YYFZBJS 对 CRC 肿瘤发生的作用, 为 CRC 的临床诊疗提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

B6.Cg-Krastm4Tyj Apctm1Tno Tg(CDX2-cre/ER^{T2})752Erf/MaraJ 简称为 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{flox/+} 是由密歇根大学实验室生成的杂合背景小鼠, 在人尾型同源盒 2 (CDX2) 基因启动子/增强子区域的下游表达 Cre-ERT2, 主要用于研究远端肠道上皮的基因功能。目前赠予美国 Jackson Laboratory, 种系编号为 #035169^[17]。6~8 周龄, 体质量 18~20 g, SPF 级。小鼠合笼方式: 将 2 只 Apc^{tm1Tno} 雄性小鼠与 4 只 Kras^{tm4Tyj} 雌性小鼠合笼繁殖, 鉴定子代小鼠的基因型, 符合基因型为 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{flox/+} 小鼠用于实验。8 只 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠, 体质量 18~20 g, SPF 级, 购自上海必凯科技生物科技有限公司 [SCXK (沪) 2018-0006] (合格证编号: 2020006048546)。动物实验经上海市第一人民医院实验动物伦理委员会审核批准后实施 (伦理审批号: 2024AWS538)。

1.2 药物与试剂

YYFZBJS (薏苡仁 30 g, 批号: 190209; 附子 6 g, 批号: 190202; 败酱草 15 g, 批号: 190218), 3 味药物的中药饮片均源自上海雷允上中药饮片厂, 经上海市第一人民医院嘉定医院临床药学主任药师鉴定, 结果符合《中国药典》2020 年版相关标准。生药检定合格, 按处方比例配方。每个药物先用清水浸泡 30 min, 大火煮沸后小火煎煮 40 min; 倒出汤汁加水进行第 2 次煎煮, 方法同前。将 2 次所煮

的汤汁混匀浓缩成质量浓度为 0.38 g·mL⁻¹ 的药液。他莫昔芬购自 Sigma-Aldrich, 货号 T5648-1G, [将 10 mg 的他莫昔芬粉末溶于 1 mL 玉米油 (货号 CAS# 8001-30-7) 放入超声波清洗仪内, 功率 100%, 室温, 超声 20 min, 即可使他莫昔芬完全溶解于玉米油中, 终质量浓度为 1 mg·mL⁻¹]。

1.3 主要仪器

PCR 仪 (美国 Bio-Rad Laboratories 公司, 型号 1861096), 电泳仪 (美国 Bio-Rad Laboratories 公司, 型号 165-5052), 数字病理切片扫描仪 (宁波江丰生物信息技术有限公司, 型号 kf-pro-005), 全自动病理组织切片机 (湖北孝感阔海医疗科技有限公司, 型号 KH-Q350), 病理组织包埋冷冻台 (湖北孝感阔海医疗科技有限公司, 型号 KH-BL1), 石蜡包埋机 (湖北孝感阔海医疗科技有限公司, 型号 KH-LQ3500), 自动制片机 (湖北孝感阔海医疗科技有限公司, 型号 KCT-13), 油浴锅 (常州苏瑞仪器有限公司, 型号 HH-S), 循环水式多用真空泵 (上海尚普仪器设备有限公司, 型号, 型号 SN-SHZ-D(III)), 冷却水循环装置 (上海尚普仪器有限公司, 型号 SN-DHC-0510), 旋转蒸发仪 (上海尚普仪器有限公司, 型号 SN-RE-2000B)。

2 方法

2.1 分组及给药

将 30 只 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{flox/+} 实验小鼠随机分组, 分为模型组和 YYFZBJS 低、中、高剂量 (3.825、7.650、15.300 g·kg⁻¹) 组; 野生 C57BL/6J 小鼠为对照组。YYFZBJS 剂量和干预时间依据前期研究^[15]: ig 给药 12 周, 0.4 mL·d⁻¹, 每周称体质量, 并记录小鼠疾病活动指数 (DAI) 评分, 12 周后脱颈处死, 并剖取小鼠肠道组织, 对肠道腺瘤的数目进行计数, 收集小鼠新鲜粪便。对照组 ig 给予 0.9% 氯化钠溶液, 0.4 mL·d⁻¹·次⁻¹。

2.2 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{flox/+} 小鼠造模

依据前期实验结果^[15]及其他课题组研究^[20], 对 6 周龄的 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{flox/+} 小鼠进行 1 mg·mL⁻¹ 的他莫昔芬 (代谢产物为 4-羟基他莫昔芬) 尾 iv。见图 1。

2.3 小鼠肿瘤数量和肿瘤负荷评估

参考 Nat Protoc^[18]和课题组前期研究^[14-15]的标准, 用肿瘤数量、肿瘤负荷来评估结直肠肿瘤的宏观情况。宏观肉眼可见的肿瘤个数, 采用标尺测量每只小鼠所有肿瘤的直径, 计算平均直径。

肿瘤负荷 = 所有肿瘤直径和/肿瘤个数

2.4 粪便标本取材及步骤

末次干预结束后次日清晨无菌、规范收集每只小鼠粪便 4~6 粒约 0.5 g。可用左手固定小鼠颈部，右手按摩小鼠腹部或刺激肛周，尽量使新鲜粪便落在灭菌的 EP 管内；标记后盖紧，-80 °C 冰箱留存待检测。

2.5 苏木素-伊红 (HE) 染色

病理检查取病变结肠组织，沿纵轴切开，常规固定、石蜡切片、HE 染色，普通光镜下观察结肠的病理组织学改变情况，主要对结肠组织炎症轻重，病变深度，隐窝和上皮破坏情况进行评价，肿瘤分级程度按肿瘤侵袭程度标准进行评分^[16]。

2.6 蛋白 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 荧光检测

组织取材后，用 OTC 包埋后冻存 -80 °C 冰箱。按照切片机参数，设置厚度：5 μm，依次切片。加入冰 4% 多聚甲醛，室温静置固定 5 min，然后加入 1 mL 的磷酸盐缓冲液 (PBS) + 0.3% Tritonx-100，室温静置 10 min，加入 1 mL PBS + 0.3% Tritonx-100 + 5% 血清牛蛋白 (BSA)，室温封闭 30 min。吸出封闭液，一抗稀释至 5% BSA + PBS + 0.3% Tritonx-100 中，4 °C 过夜。次日回收一抗，PBS 摇洗 3 次，每次 10 min，二抗稀释至 5% BSA + PBS + 0.3% Tritonx-100 中，室温避光孵育 1 h。按照 1 : 1 000 稀释 DAPI，室温避光孵育 15 min 后，用 1 × PBS 清洗 3 次，每次 5 min。加入抗荧光猝灭剂，在共聚焦显微镜下拍照。

2.7 网络药理学分析

2.7.1 YYFZBJS 活性成分及 CRC 靶点的信息收集 在中药系统药理学分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3) 中，分别以薏苡仁、附子、败酱草作为关键词，检索 YYFZBJS 的主要活性成分。根据搜索结果，以类药性 (DL) ≥ 0.18 和口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 作为筛选条件，确定 YYFZBJS 中的活性成分。将收集到的活性成分上传至 UniProt 平台，以获得活性成分相对应的作用靶点。以 “intestinal cancer” “colorectal cancer” 作为搜索词，在 GeneCards、MalaCards 及 DisGeNET 等平台上获取与 CRC 相关的靶点信息。将 3 个平台中得到的靶点进行统计，同时将 3 个平台中重合的基因进行记录，将重合基因作为 CRC 的治疗靶点。

2.7.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建 将活性成分和疾病共有靶点导入 STRING 数据库，以物种选择 “Homo sapiens”，设定分阈值为 0.700，

以确保高置信度。使用 Cytoscape 软件 (版本 3.9.0) 构建 PPI 网络，网络中以节点显示蛋白，以边展示交互作用，节点的颜色和大小反映不同的度值。更大且颜色更红的节点表示度值更高，指示更关键的靶点。对前 20 个关键靶点进行了聚类分析，以进一步阐释网络特性。

2.7.3 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 使用 Metascape 进行 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析时，首先将共有靶点上传至 Metascape 网站。设置参数为 Min Overlap=3、P Value Cutoff=0.01 及 Min Enrichment=1.5。完成富集分析后，按 P 值排序并导出聚类网络，展示前 20 个 KEGG 通路富集结果和前 15 个 GO 富集结果。

2.7.4 “成分-靶点-疾病” 网络构建与分析 将 YYFZBJS 的活性成分、PPI 网络中的关键靶点及 KEGG 富集分析得到的关键通路结果导入 Cytoscape 3.9.0，建立 “YYFZBJS-活性成分-关键靶点富集通路” 的可视化网络。

2.7.5 分子对接 从 PubChem 数据库中下载 “成分-靶点-疾病” 网络中度值排名前 3 的关键成分的 SDF 文件，作为配体文件。在 Protein Data Bank 数据库下载 PPI 网络中度值排名前 4 的核心靶点的 PDB 结构，作为受体文件。利用 AutoDock Tools 1.5.7 对受体进一步加氢、去水等处理，使用 Autodock Vina 1.5.6 进行 12 次分子对接并计算结果。

2.8 Western blotting 检测

取各组小鼠肠道肿瘤组织，置研钵中研细，加入含苯甲磺酰氟 (PMSF)、蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取蛋白，离心后加入蛋白缓冲液，于 100 °C 恒温水浴 10 min 将蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5% 脱脂牛奶，室温封闭 1 h，分别加入 AhR、IDO1 抗体 (1 : 1 000)、 β -catenin 抗体 (1 : 5 000)、GAPDH 作为内参。4 °C 孵育过夜；TBST 洗涤 3 次后，加入二抗 (1 : 10 000)，室温避光摇床 1 h，TBST 洗涤 3 次后，使用凝胶成像系统显影，利用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 统计学方法

运用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析，计量资料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于正态分布的数据，多组间比较采用单因素方差分析，不满足正态分布的数据采用非参数秩和检验。以 $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CRC 基因工程小鼠工作原理和 PCR 鉴定

通过 Cre-loxp^[19]系统, 条件性敲除了小鼠结肠上皮细胞 Apc 基因, 激活了 Kras 基因, 产生了基因工程小鼠 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}, 即自发地产生结直肠肿瘤的基因工程小鼠 (图 1-A)。通过 PCR 扩增后, Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠基因型鉴定图谱显示: APC 纯合基因在 400 bp 处有 1 条突变型 DNA 条带, KRAS 杂合基因分别在 100 bp 和 250 bp 处有 2 条突变型 DNA 条带, CRE 阳性基因分别在 200 bp 和 324 bp 处有 2 条

DNA 条带。代表性的基因型鉴定结果见图 2-B。

3.2 YYFZBJS 对 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠结直肠肿瘤的抑制作用

与对照组比较, 模型组结肠长度显著缩短, 肿瘤数量为 8.88 ± 2.03 , 差异显著。YYFZBJS 干预后的 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠肠道腺瘤的数量明显减少, 低剂量组肿瘤数量为 7.88 ± 2.00 , 中剂量组肿瘤数量为 6.13 ± 2.17 , 高剂量组肿瘤数量为 3.13 ± 1.55 , 其中尤以 YYFZBJS 高剂量最为显著 ($P < 0.01$)。表明 YYFZBJS 具有减少肠道腺瘤, 降低肿瘤负荷的作用, 且随着 YYFZBJS 剂量的增加, 效果显著。见图 3。

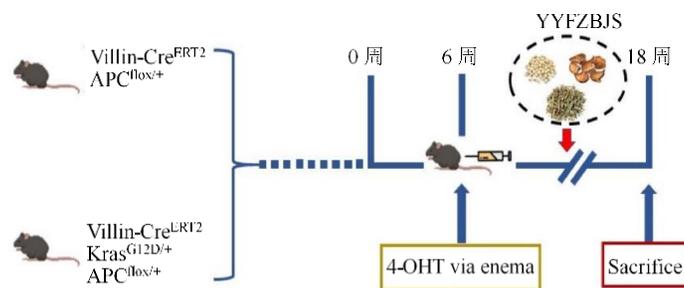
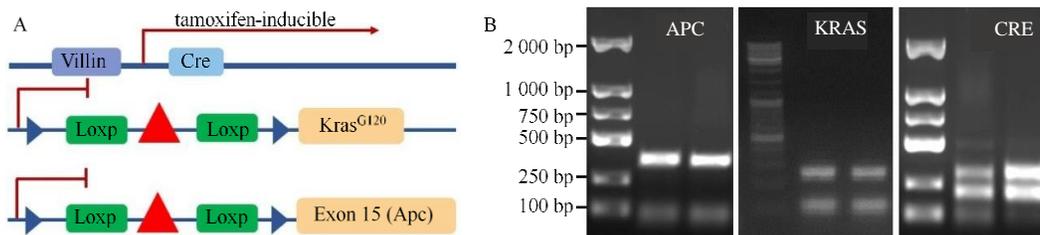


图 1 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠建模及分组给药

Fig. 1 Diagram of Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+} mouse modeling and group administration

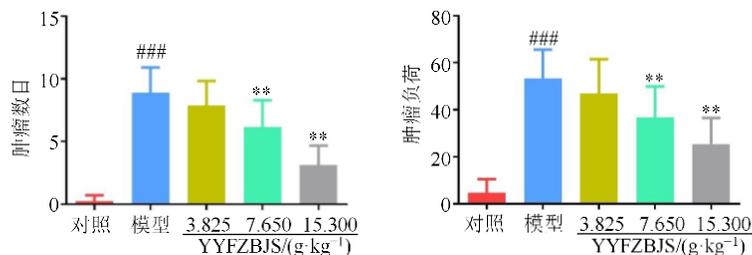


A-Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠基因重组示意图; B-PCR 凝胶电泳。

A-Genetic recombination diagram of Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+} mouse; B-PCR gel electrophoresis.

图 2 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠的各基因重组和表达

Fig. 2 Gene recombination and expression in Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+} mice



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 3 YYFZBJS 对 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠结直肠肿瘤的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 3 Inhibitory effect of YYFZBJS on colorectal tumors in Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+} mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

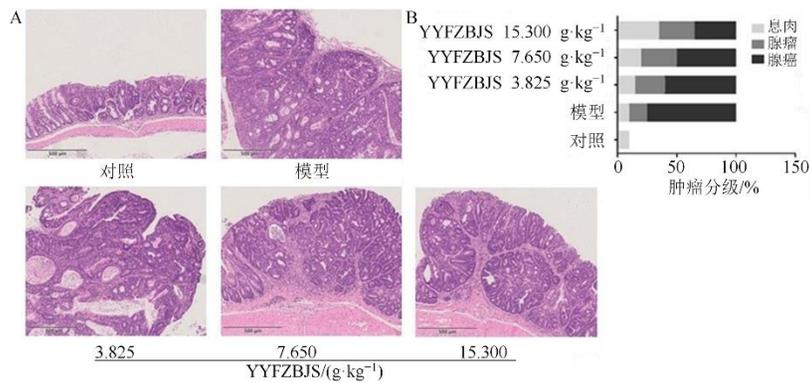
3.3 YYFZBJS 对 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D}/⁺ Apc^{fllox}/⁺ 小鼠肠道细胞恶性癌变的作用

与对照组相比,随着小鼠周龄增加, Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D}/⁺ Apc^{fllox}/⁺ 小鼠(模型组)出现毛色光泽度变差、便溏甚至便血、爪甲发白等。经过 YYFZBJS ig 治疗后,小鼠大便隐血现象减少,大便成形良好,其中以 YYFZBJS 高剂量改善效果最为明显。组织学上,对照组小鼠腺体结构正常,黏膜层结构清晰,无黏膜溃疡,但腺上皮细胞出现稍许异型;模型组小鼠结肠组织病理显示腺体密集,呈筛孔状结构排列,腺上皮细胞异型增生明显,细胞核明显增大并可见病理性核分裂,间质部分慢性炎症细胞浸润,诊断为高级别上皮内瘤变或腺癌(图 4-A)。与模型组相比,YYFZBJS 组形成的肿瘤经病

理评价为腺瘤(管状腺瘤可能),局限在黏膜下层,腺癌的数量减少,腺瘤的数量增加(图 4-B)。

3.4 YYFZBJS 对 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D}/⁺ Apc^{fllox}/⁺ 小鼠肠道细胞 BrdU 表达的作用

BrdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,其能在细胞 DNA 合成期(S 期)代替胸腺嘧啶掺杂在新的 DNA 分子内,通过与 DNA 的特定染色染料 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 进行双染实验,进而可以检测细胞增殖期 DNA 复制活性的状况^[21]。免疫组织化学染色结果分析发现,在 YYFZBJS 干预后, BrdU 阳性细胞的百分比大大下降,说明参与 DNA 复制的细胞数目显著减少;并且随着 YYFZBJS 剂量的增加,增殖细胞的数目越来越少,提示 YYFZBJS 具有抑制肿瘤细胞增殖期 DNA 复制的作用(图 5)。

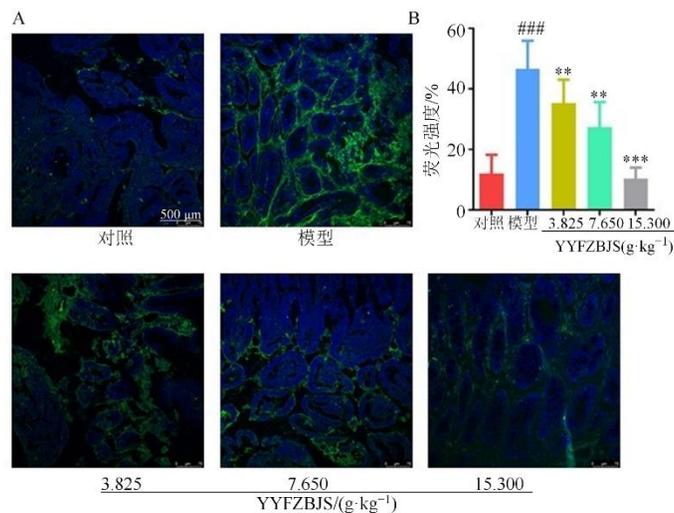


A-各组小鼠肠道肿瘤 HE 染色; B-各组小鼠肠道肿瘤组织的病理评分。

A-HE staining of intestinal tumors in each group; B-Pathological score of intestinal tumor tissue of mice in each group.

图 4 YYFZBJS 对 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D}/⁺ Apc^{fllox}/⁺ 小鼠肠道肿瘤病理评分 (HE 染色, ×100)

Fig. 4 Pathological scores of intestinal tumors in Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D}/⁺ Apc^{fllox}/⁺ mice by YYFZBJS (HE staining, ×100)



与对照组比较: ###P<0.001; 与模型组比较: **P<0.01 ***P<0.001。

###P<0.001 vs control group; **P<0.01 ***P<0.001 vs model group.

图 5 YYFZBJS 对 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D}/⁺ Apc^{fllox}/⁺ 小鼠肠道细胞 BrdU 表达的作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 5 Effect of YYFZBJS on BrdU expression in Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D}/⁺ Apc^{fllox}/⁺ mouse intestinal cells ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.5 YYFZBJS 的网络药理学分析

3.5.1 YYFZBJS 的活性成分及其靶点筛选 在 TCMSMP 数据库中检索并筛选后, 共得到 YYFZBJS 的 121 个活性成分。通过 UniProt 平台分析, 这些活性成分对应的作用靶点共计 663 个。通过 GeneCards、MalaCards 及 DisGeNET 数据库, 共收集到与 CRC 治疗相关的重合靶点 933 个。随后, 通过韦恩图分析活性成分作用靶点与 CRC 治疗靶点的交集, 最终确定 YYFZBJS 与 CRC 的共同靶点为 183 个。

为了获得有关潜在靶点交互作用的信息, 将 183 个共同靶点导入 STRING 平台, 构建了 PPI 网络。下载其数据导入 Cytoscape 3.9.0, 筛选核心靶点, 节点越大、颜色越深、连接越密集, 表示该节点在网络中的重要性越高。见图 6。

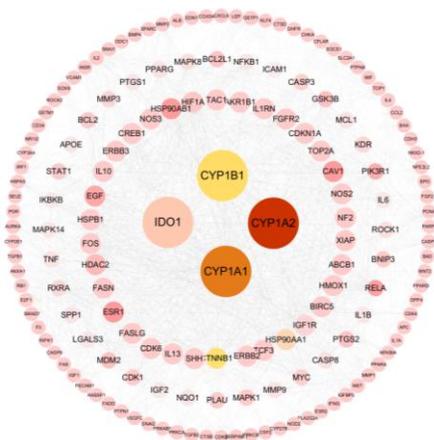


图 6 YYFZBJS 治疗 CRC 潜在靶点的 PPI 网络

Fig. 6 PPI network of YYFZBJS for potential targets of CRC

3.5.2 YYFZBJS 的 GO、KEGG 通路网络图的构建与分析 如图 7 所示, KEGG 路径富集分析确认了 271 条路径, 前 20 条富集路径 (排除与寄生虫和感染相关的路径) 表明: YYFZBJS 可能通过多种信号通路, 如凋亡、细胞增殖通路、炎症信号通路和肿瘤代谢通路, 涉及抑制细胞死亡、炎症和代谢重编程等多种治疗手段介入 CRC。通过对 GO 功能进行富集分析 (图 8), 进一步发现, 生物过程 (BP) 主要集中于细胞对机械刺激的反应 (cellular response to mechanical stimulus)、对低氧生物刺激的反应 (response to hypoxic stimulus)、对有机生物刺激的反应 (response to xenobiotic stimulus) 等方面; 细胞组成 (CC) 主要集中于 RNA 聚合酶 II (RNA polymerase II)、转录调节复合物 (transcription regulator complex) 和蛋白质复合物 (protein-containing complex) 等部位; 分子功能 (MF) 主要集中于核受体活性 (nuclear receptor activity)、细胞因子活性 (cytokine activity) 和酶结合 (enzyme binding) 等方面。综合这些结果, 发现 YYFZBJS 可能通过控制代谢重编程、调节细胞周期、抑制癌细胞增殖、抗炎反应特性来对 CRC 产生治疗作用。

3.5.3 “药物-化合物-靶点”的网络构建 根据上述结果, 构建了一个 YYFZBJS-化合物-关键靶点-路径可视化网络, 见图 9。并进行拓扑分析, 通过分析节点度值 (即化合物在网络中与其他节点连接的数量), 确定了槲皮素、山柰酚和氨基苯酚是关键生物活性化合物。这些化合物通过靶向 IDO1、细胞色素 P450 1A1 (CYP1A1)、CYP1A2 和 CYP1B1。由于

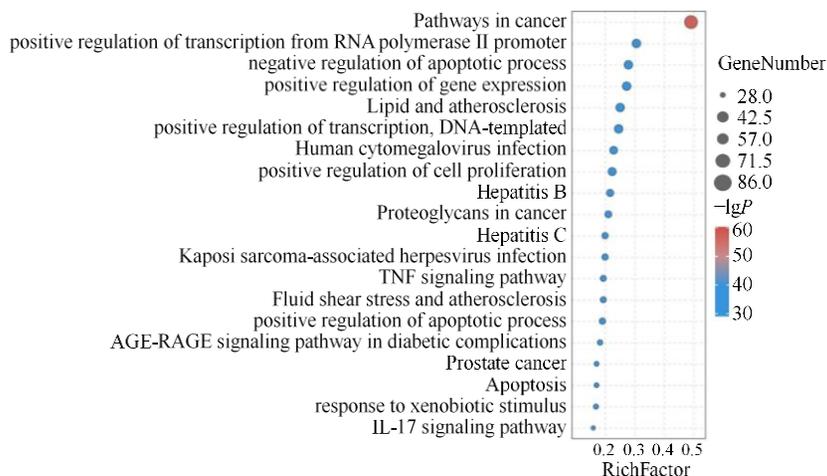


图 7 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 7 Bubble map of KEGG enrichment analysis

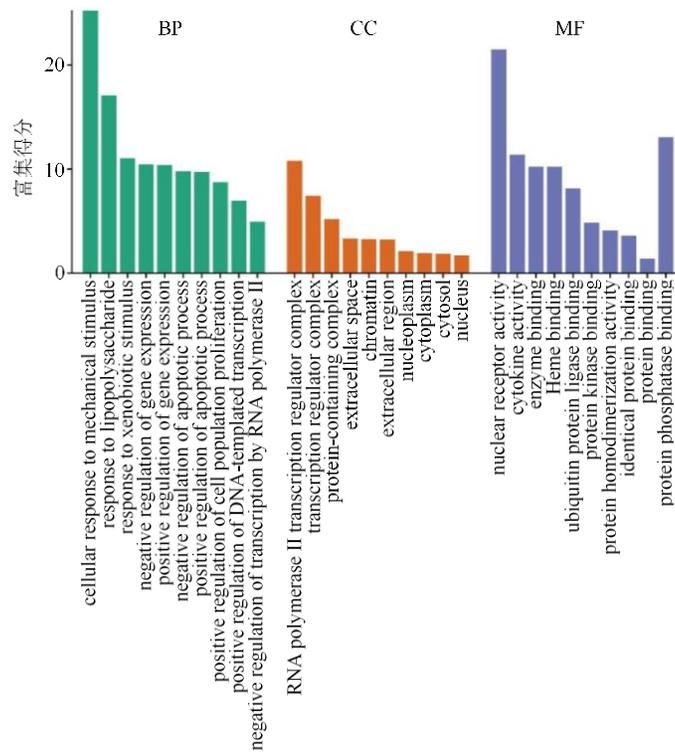


图 8 GO 分析结果

Fig. 8 Result of GO analysis

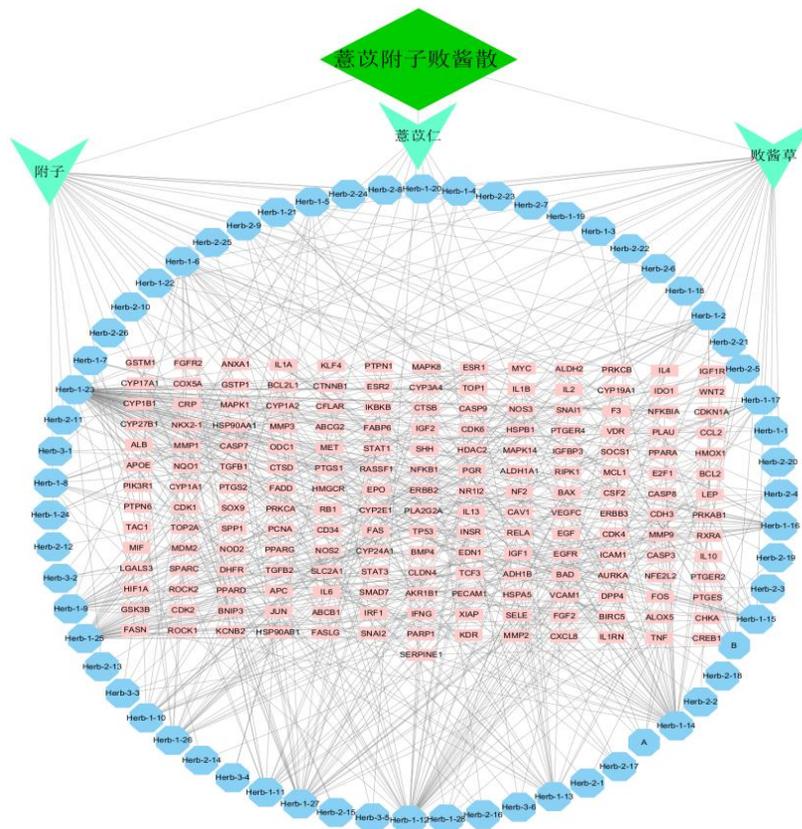


图 9 YYFZBJS 治疗 CRC 的“药物-化合物-靶点”的网络

Fig. 9 "Drug-compound-target" network with YYFZBJS for treatment of CRC

IDO1 作为 AhR 上游主要靶效应因子，而细胞色素 P450 作为 AhR 下游主要靶效应因子^[22-23]，因此推测 YYFZBJS 可能调节 IDO1/AhR/ β -catenin 信号通路，从而对 CRC 产生治疗作用。

3.5.4 分子对接 运用分子对接对 4 个核心靶点：IDO1、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1 和“活性成分-疾病-靶点”网络中度值排名前 3 的有效成分：槲皮素、山柰酚、氨基苯酚进行分析。结果显示，各小分子与蛋白对接的结合能均 $< -20.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，说明各小分子与核心靶点各蛋白均具有较好的结合活性（图 10）。

3.6 YYFZBJS 对 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠肠道肿瘤 IDO1/AhR/ β -catenin 信号通路的调节作用

基于网络药理学提示的 IDO1/AhR 通路及其下游 Wnt/ β -catenin 信号通路，考察 YYFZBJS 对 Villin-

CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠肠道肿瘤组织中 AhR、IDO1、 β -catenin 蛋白表达的影响。结果显示，相对于正常小鼠，模型小鼠的肿瘤组织中 AhR、IDO1、 β -catenin 蛋白表达升高。与模型组相比，YYFZBJS 3 个剂量组肿瘤组织中 AhR、IDO1、 β -catenin 蛋白水平均有所下降，且呈剂量相关性，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 11。

4 讨论

从结肠肿瘤向结肠癌的转变是一个复杂的过程，自发性 CRC 模型 ApcMin^{+/+}（抑癌基因结肠腺瘤性息肉病，Apc）基因小鼠制备成功以来，各国研究者以 Apc 基因为代表的各种基因突变，先后建立了多种结肠癌基因工程模型^[24]。本研究采用的 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠结肠癌自发模型，非常接近于人类癌症 Apc 和 Kras 基因突变的特征，可以有效模拟人体肿瘤发生的病理过程。

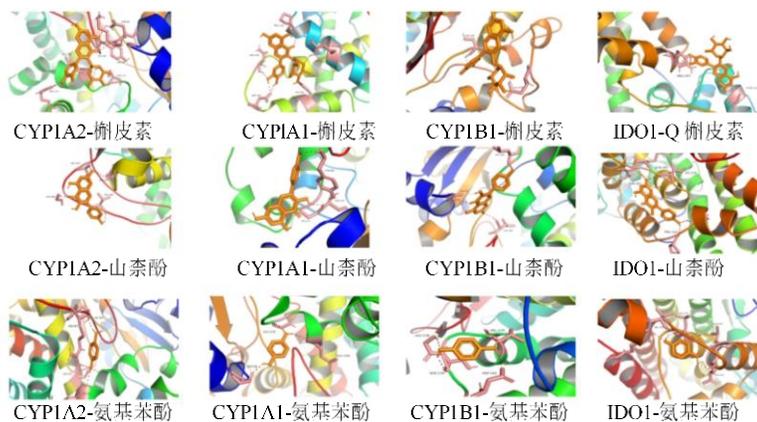
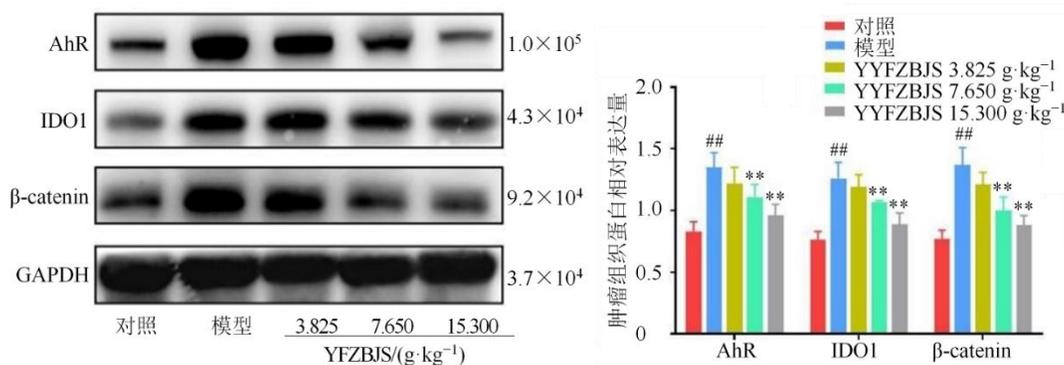


图 10 YYFZBJS 活性成分与核心靶点的分子对接示意图

Fig. 10 Molecular docking diagram of YYFZBJS active ingredient and core target



与对照组比较：## $P < 0.001$ ；与模型组比较：** $P < 0.01$ 。
$P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group.

图 11 YYFZBJS 对 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠 IDO/AhR 信号途径关键蛋白的调节作用 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 11 Regulatory effect of YYFZBJS on key proteins of IDO/AhR signaling pathway in Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+} mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

在结肠癌的防治中，“内痈论治”是临床最常用的辨治思想，临床研究发现肠痈代表方 YYFZBJS 对 CRC 早期病变疗效显著，临床获益优于其他治疗方式^[25-26]。YYFZBJS 由薏苡仁，败酱草，附子 3 味药组成，组方精练。其中薏苡仁甘淡微寒，健脾利湿排脓，败酱草味苦性平，排脓破瘀，两者均为治痈之要药。附子性甘热，其性善走，走而不守，通行十二经，是治阳虚诸症之要药，取其温热通阳之性助化祛湿，全方寒温并用，标本兼顾^[27-28]。

课题组前期研究发现 YYFZBJS 可改善 AOM/DSS 诱导的小鼠结肠癌炎症转化动物模型，减轻小鼠的腹泻、脱肛等 CRC 前病变等症状；减少大肠肿瘤的数量、大小及肿瘤负荷等；并且呈剂量相关性地降低肿瘤组织中癌症基因编码的 PCNA 和 Ki67 蛋白的表达^[16]。深入研究发现：YYFZBJS 能够逆转 TAMs 的 M2 型极化，限制 STAT3 介导的内质网应激传递，抑制大肠癌的发生^[29]。在本研究中，YYFZBJS 能够有效减少肠道肿瘤负荷的作用，且呈剂量相关性。代表细胞增殖的 BrdU 结果同样显示，与模型组相比，YYFZBJS 可以显著降低肿瘤细胞的 BrdU 表达，以 YYFZBJS 高剂量效果最为明显。然而，YYFZBJS 在体内发挥抗肿瘤发生的药效作用分子机制尚不完全明确，限制了其深层次研究。故本研究以 YYFZBJS 与 CRC 共同作用靶点为筛选对象，采用网络药理学方法对 YYFZBJS 作用靶点及信号通路进行预测，并将潜在的 183 个潜在靶点进行了 PPI 分析，发现 YYFZBJS 可能主要作用于 IDO1、CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1 等核心靶点。

其中，IDO1 是犬尿氨酸 (Kyn) 代谢途径的限速酶，是组成 Trp/Kyn 的重要因素^[30]。Trp 主要有 3 个代谢分解途径，其中，最为主要的 Kyn，转化将近 95% 的 Trp^[31]。在肿瘤微环境中，IDO1 活性的增加抑制了 T 细胞的增殖，并诱导细胞凋亡^[32]。而且，IDO 的过表达已被证明与 CRC 患者的不良结局相关^[33]，使用 IDO 抑制剂 1-MT 能够纠正 IDO 介导的免疫逃逸，从而抑制 AOM 诱导的 CRC 发生^[34]。此外，IDO1 也是 AhR 的内源性配体，多项研究表明阻断 IDO1-AhR 轴能够介导 Treg 分化，从而能够影响 CRC 的发生、发展^[35-36]。课题组前期研究证实：Trp/Kyn 介导的 AhR/ β -catenin 通路是诱导 CRC 发生的重要因素，AhR 启动细胞核内的 β -catenin 的磷酸化，上调 TCF/LEF 表达，形成 IDO1/AhR/ β -catenin 信号途径^[30]。因此，调控 IDO1/AhR/ β -catenin

通路上下游靶点可能是 YYFZBJS 预防 CRC 的一个新思路。

网络药理学结果表明槲皮素、山柰酚、氨基苯酚是其关键生物活性化合物，主要富集于 IDO1/AhR/ β -catenin 信号通路。已有数据显示，在人宫颈癌的研究中，槲皮素能够明显抑制 IDO1 的体外酶催化活性，通过外源性 Trp 的代谢产物 Kyn 途径，从而逆转槲皮素引起的细胞增殖抑制^[37]。因此，在体外研究中，基于网络药理学提示的 IDO1/AhR 通路及其下游 Wnt/ β -catenin 信号通路，通过 WB 结果显示与模型组相比，YYFZBJS 的 3 种剂量在肿瘤组织中 IDO1、AhR、 β -catenin 蛋白水平平均有所下降，且呈剂量相关性，表明 YYFZBJ 可能通过调节 Trp 介导的 IDO1/AhR/ β -catenin 途径有效抑制自发 CRC 的发生。

综上所述，经方 YYFZBJS 可以降低肠道自发性肿瘤模型 Villin-CreER^{T2}Kras^{G12D/+}Apc^{fllox/+}小鼠的肠道肿瘤数量和肿瘤负荷。减少便血、便溏等状态，显著抑制肿瘤细胞增殖，其作用机制可能是通过调节 Trp 介导的 IDO1/AhR/ β -catenin 途径有效抑制自发 CRC 的发生。但本研究仍有一定的不足之处：

(1) 考虑临床没有明确的药物治疗自发性肠道肿瘤，药效研究中未设立阳性对照组；(2) IDO1/AhR 是 Trp 代谢的重要环节，而本研究尚未涉及代谢组学的相关研究，后续工作将深入挖掘中医药在代谢过程及肠道微环境中的具体作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zheng R S, Zhang S W, Zeng H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2016 [J]. J Natl Cancer Cent, 2022, 2(1): 1-9.
- [2] 惠逸帆, 赵硕琪, 凌亭生, 等. 结直肠癌中西医结合防治指南 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(23): 6269-6277.
- [3] Hui Y F, Zhao S Q, Ling T S, et al. Guidelines for prevention and treatment of colorectal adenoma with integrated Chinese and western medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(23): 6269-6277.
- [3] 朱健伟, 徐鹏, 王善娟. 结直肠癌发生和复发的危险因素分析 [J]. 国际消化病杂志, 2023, 43(3): 196-199, 212.
- [4] Zhu J W, Xu P, Wang S J. Analysis of risk factors for occurrence and recurrence of colorectal adenoma [J]. Int J Dig Dis, 2023, 43(3): 196-199, 212.
- [4] 中国中西医结合学会消化内镜学专业委员会大肠早癌

- 专家委员会. 结直肠腺瘤及早期结直肠癌中西医结合诊治专家共识 (2021) [J]. 中医杂志, 2022, 63(10): 989-997.
- Expert Committee of Early Colorectal Cancer of Digestive Endoscopy Professional Committee of Chinese Association of Integrative Medicine. Expert Consensus on the Diagnosis and Treatment of Colorectal Adenoma and Early Rectal Cancer with Integrated Traditional Chinese and Western Medicine (2021) [J]. J Tradit Chin Med, 2022, 63(10): 989-997.
- [5] Moon C M, Jung S A, Eun C S, et al. The effect of small or diminutive adenomas at baseline colonoscopy on the risk of developing metachronous advanced colorectal neoplasia: KASID multicenter study [J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(8): 847-852.
- [6] 杨森, 刘建平, 刘龙辉, 等. 李佃贵基于浊毒理论从脾胃防治结直肠腺瘤进展经验 [J]. 中医药导报, 2023, 29(5): 148-150, 153.
- Yang S, Liu J P, Liu L H, et al. Li Diangui's experience in preventing and treating colorectal adenoma from spleen and stomach based on turbid toxin theory [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2023, 29(5): 148-150, 153.
- [7] 叶慧珍, 程怡, 钟彩玲, 等. 基于伏毒病机探讨结直肠腺瘤术后复发的防治思路 [J]. 广州中医药大学学报, 2023, 40(6): 1527-1531.
- Ye H Z, Cheng Y, Zhong C L, et al. Exploration of the thoughts for the prevention and treatment of postoperative recurrence of colorectal adenoma based on the pathogenesis of latent toxin [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2023, 40(6): 1527-1531.
- [8] 刘书君, 程怡, 黄佩娣, 等. 结直肠腺瘤湿证量化诊断方法的探索性研究 [J]. 中医杂志, 2023, 64(20): 2071-2076.
- Liu S J, Cheng Y, Huang P D, et al. Exploratory study on quantitative diagnostic of dampness syndrome of colorectal adenoma [J]. J Tradit Chin Med, 2023, 64(20): 2071-2076.
- [9] 鲁仕昱, 高静静, 田继云, 等. 白花蛇舌草干预湿热瘀滞型肠内多发息肉术后复发的临床研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(9): 1855-1862.
- Lu S Y, Gao J J, Tian J Y, et al. Clinical study on intervention of Hedyotis diffusa on postoperative recurrence of multiple intestinal polyps of damp-heat stasis type [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(9): 1855-1862.
- [10] 刘访, 史仁杰, 曹波. 结直肠腺瘤的中医研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(27): 3070-3074.
- Liu F, Shi R J, Cao B. Research progress of colorectal adenoma in traditional Chinese medicine [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2020, 29(27): 3070-3074.
- [11] 俞媛, 张婷, 王卿华, 等. 益气活血方联合穴位注射对结直肠腺瘤性息肉切除术后肠道功能的影响 [J]. 山西中医, 2023, 39(4): 15-17.
- Yu Y, Zhang T, Wang Q H, et al. Effect of Yiqi Huoxue formula and acupoint injection on intestinal function after resection of colorectal adenomatous polyp [J]. Shanxi J Tradit Chin Med, 2023, 39(4): 15-17.
- [12] 李付平, 靳子明, 刘成松, 等. 黄芪活性成分抗结肠癌作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(10): 3549-3557.
- Li F P, Jin Z M, Liu C S, et al. Research progress on mechanism of active ingredients of *Astragali Radix* against colon cancer [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2024, 55(10): 3549-3557.
- [13] 张转红, 刘婷, 高飞云, 等. 中药抑制结肠癌血管生成的作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 948-955.
- Zhang Z H, Liu T, Gao F Y, et al. Research progress on mechanism of traditional Chinese medicine inhibiting colon cancer angiogenesis [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2023, 54(3): 948-955.
- [14] 张璐. 薏苡附子败酱散调节肠道菌群防治结直肠腺瘤的研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2021.
- Zhang L. Study on prevention and treatment of colorectal adenoma by regulating intestinal flora with *Coix lacryma-jobi* Fuzi Baijiang powder [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [15] Sui H, Zhang L, Gu K J, et al. YYFZBJS ameliorates colorectal cancer progression in ApcMin/+ mice by remodeling gut microbiota and inhibiting regulatory T-cell generation [J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 113.
- [16] Zhang Y L, Chai N, Wei Z Z, et al. YYFZBJS inhibits colorectal tumorigenesis by enhancing Tregs-induced immunosuppression through HIF-1 α mediated hypoxia *in vivo* and *in vitro* [J]. Phytomedicine, 2022, 98: 153917.
- [17] 朱宁馨. 结直肠癌模型中肿瘤细胞的生物学行为及转移模式研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2022.
- Zhu N X. Study on biological behavior and metastasis pattern of tumor cells in colorectal cancer model [D]. Changsha: Central South University, 2022.
- [18] Neufert C, Becker C, Neurath M F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression [J]. Nat Protoc, 2007, 2(8): 1998-2004.
- [19] Maitra R, Thavornwatanayong T, Venkatesh M K, et al. Development and characterization of a genetic mouse model of KRAS mutated colorectal cancer [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(22): 5677.

- [20] Liu H S, Liang Z X, Cheng S J, et al. Mutant KRAS drives immune evasion by sensitizing cytotoxic T-cells to activation-induced cell death in colorectal cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, 10(6): e2203757.
- [21] 张伟, 任长虹, 吴晓丹, 等. 当归芍药散活血利水不同配伍对缺血性脑卒中小鼠血管新生的影响 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(1): 56-62.
- Zhang W, Ren C H, Wu X D, et al. Danggui Shaoyao San regulates angiogenesis in ischemic stroke mice through blood activating and/or body fluid transportation and transformation actions [J]. *Drug Eval Res*, 2021, 44(1): 56-62.
- [22] Taddese R, Roelofs R, Draper D, et al. Streptococcus gallolyticus increases expression and activity of aryl hydrocarbon receptor-dependent CYP1 biotransformation capacity in colorectal epithelial cells [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 740704.
- [23] Fong W, Li Q, Ji F F, et al. Lactobacillus gallinarum-derived metabolites boost anti-PD1 efficacy in colorectal cancer by inhibiting regulatory T cells through modulating IDO1/Kyn/AHR axis [J]. *Gut*, 2023, 72(12): 2272-2285.
- [24] 安庆玲, 谭邓旭, 师长宏. 结直肠癌基因工程小鼠模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(5): 660-667.
- An Q L, Tan D X, Shi C H. Genetically engineered mouse models of colorectal cancer [J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2023, 31(5): 660-667.
- [25] 李娟, 杨柱, 龙奉玺, 等. 国医大师刘尚义教授薏苡附子败酱散医案举隅 [J]. *成都中医药大学学报*, 2017, 40(4): 66-68.
- Li J, Yang Z, Long F X, et al. Three medical cases treated with YiyiFuZiBaijiang San by professor Liu Shang-yi [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med*, 2017, 40(4): 66-68.
- [26] 王三虎. 薏苡附子败酱散 [J]. *河南中医*, 2017, 37(11): 1955.
- Wang S H. *Coix lacryma-jobi Fuzi Patrinia* powder [J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2017, 37(11): 1955.
- [27] 阎旻宇, 李冰融, 蒋君涛, 等. 薏苡附子败酱散联合电针治疗对 AOM/DSS 小鼠炎症相关性结直肠癌的防治作用及机制 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(13): 2405-2411.
- Yan M Y, Li B R, Jiang J T, et al. Effect and mechanism of Yiyi Fuzi Baijiang San combined with electroacupuncture on co-litis-associated colorectal cancer in AOM/DSS mice [J]. *J Mod Oncol*, 2023, 31(13): 2405-2411.
- [28] 张璐, 隋华, 伏杰, 等. 经方对条件性基因敲除 APCMin/+ 小鼠肠道腺瘤发生和肠道菌群的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(5): 2327-2332.
- Zhang L, Sui H, Fu J, et al. Effects of classical prescription on intestinal adenoma and intestinal microflora in conditional gene knockout APCMin/+ mice [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35(5): 2327-2332.
- [29] Chai N, Xiong Y B, Zhang Y L, et al. YYFZBJS inhibits colorectal tumorigenesis by remodeling gut microbiota and influence on M2 macrophage polarization *in vivo* and *in vitro* [J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(11): 5338-5357.
- [30] Zhang L, Ji Q, Chen Q, et al. Akkermansia muciniphila inhibits tryptophan metabolism via the AhR/ β -catenin signaling pathway to counter the progression of colorectal cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(14): 4393-4410.
- [31] Wang G, Huang S, Wang Y M, et al. Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(20): 3917-3937.
- [32] Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, et al. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2, 3-dioxygenase [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(4): 459-468.
- [33] Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, et al. Prognostic value of indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in colorectal cancer: Effect on tumor-infiltrating T cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(4): 1144-1151.
- [34] Chung K T, Gadupudi G S. Possible roles of excess tryptophan metabolites in cancer [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2011, 52(2): 81-104.
- [35] Fong W, Li Q, Ji F F, et al. Lactobacillus gallinarum-derived metabolites boost anti-PD1 efficacy in colorectal cancer by inhibiting regulatory T cells through modulating IDO1/Kyn/AHR axis [J]. *Gut*, 2023, 72(12): 2272-2285.
- [36] Zhang X, Liu X T, Zhou W, et al. Blockade of IDO-kynurenine-AhR axis ameliorated colitis-associated colon cancer via inhibiting immune tolerance [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 12(4): 1179-1199.
- [37] 张薇, 何龙, 刘潇忆, 等. 槲皮素通过影响吲哚胺-2, 3-双加氧酶活性抑制 HeLa 细胞增殖的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(2): 219-224.
- Zhang W, He L, Liu X Y, et al. Quercetin inhibits proliferation of human cervical carcinoma HeLa cells through affecting tryptophan metabolism [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2018, 34(2): 219-224.

[责任编辑 齐静雯]